

Oponentský posudek diplomové práce

Nicola Koupilová: Strukturní charakterizace lidské proteinkinasy CaMKK2 a jejích interakcí s vazebnými partnery

Diplomová práce Nicoloy Koupilové se zabývala studiem lidské proteinkinasy CaMKK2 a její interakce s isoformou γ proteinu 14-3-3. V této interakci hrají podstatnou úlohu fosforylace CaMKK2 v různých pozicích a z tohoto důvodu byly ke studiu použity mutantní proteiny CaMKK2, které měly některá fosforylační místa zmutována na alanin. Součástí diplomové práce byla i optimalizace fosforylačního protokolu. Vlastní výzkum interakce obou proteinů pak využíval metod analytické ultracentrifugace, maloúhlového rozptylu rentgenového záření, chemického zesílení analyzovaného pomocí hmotnostní spektrometrie a vodík-deuteriové výměny analyzované rovněž pomocí stejné metody. Získané údaje pak byly použity k vytvoření „rigid body“ modelu komplexu obou proteinů.

Diplomová práce má 89 stran, 54 obrázků a je členěna klasickým způsobem. Seznam literatury obsahuje 55 citací odborné literatury. Práce je psána srozumitelně, přehledně a má i dobrou grafickou úroveň. Zvláště je nutno vyzdvihnout, že práce v sobě obsahuje široký rozsah metod, počínaje expresí a purifikací proteinových konstruktů, přes několik pokročilých biofyzikálně chemických experimentálních metod až k matematickému modelování zohledňujícímu získaná naměřená data. Použité metody jsou dobře popsány, jak z hlediska svých teoretických základů, tak i z hlediska všech detailů potřebných pro reprodukovatelnost experimentů. Vědecky nejvýznamnějším výsledkem práce je nepochybně konečná syntéza dat, vyúsťující ve vytvoření modelu komplexu.

K práci mám několik poznámek:

- 1) V případě popisu zamražení proteinových vzorků (str. 28) by bylo lépe uvést přesně, jak k tomu došlo; (např. zamražením do tekutého dusíku a následným uložením při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$).
- 2) Typické dělení obsahu práce do celků úvodu, metod, výsledků a diskuse, není vždy prakticky respektováno, a tak se v části Výsledky občas popisuje i něco z metod, nebo se v části Diskuse objevují pasáže připomínající spíše literární úvod. Tyto nedostatky jsou ale spíše drobné a celkové zaměření uvedených kapitol zůstává správné a obvyklé.

K práci mám tyto dotazy:

1. Poměrně klíčovým momentem práce byl výběr dvou mutantů, tedy D330A v jednom případě a T145A D330A S495A ve druhém případě. Přestože to z textu práce nakonec vyplývá, bylo by možná dobré vysvětlit logiku použití těchto mutací, protože ve vlastní práci to explicitně popsáno není.

2. Pro práci byla použita isoforma 14-3-3 γ a to ještě ve své zkrácené formě. Bylo by možno objasnit, proč zrovna tato isoforma a jaký je důvod jejího zkrácení?
3. Při vytvoření studovaného komplexu byla jako metoda ověření použita nativní elektroforéza. Bylo by možno uvažovat o doplnění pomocí měření enzymové aktivity komplexu, resp. je taková enzymová esej dostupná a domníváte se, že by její použití bylo přínosné?
4. V práci je uvedeno, že se jednotlivé mutantní formy lišily náchylností k degradaci. Lze diskutovat proč k této degradaci dochází, případně porovnat stabilitu s přirozenou formou proteinu (nemutovanou)?

Z mého posudku myslím vyplývá, že práci považuji za velmi kvalitní. Podle mého mínění jistě splňuje podmínky, které jsou na takovou práci kladeny. Doporučuji proto přijmout ji k další obhajobě a hodnotit ji stupněm A (výborně).

V Praze 1. 7. 2021

RNDr. Jiří Pavlíček, Ph.D.